

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Giessen

Direktoren: Prof. Dr. med. H. J. Dengler, Prof. Dr. med. H. A. Kühn, Prof. Dr. med. H. G. Lasch

**Untersuchungen zur Ursache
der Thrombopenie bei der experimentellen
Galaktosaminhepatitis der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Manfred Conradt

Giessen 1970

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Giessen

Direktoren: Prof. Dr. med. H. J. Dengler, Prof. Dr. med. H. A. Kühn, Prof. Dr. med. H. G. Lasch

Untersuchungen zur Ursache der Thrombopenie bei der experimentellen Galaktosaminhepatitis der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Giessen



vorgelegt von
Manfred Conradt

Giessen 1970

Dekan: Prof. Dr. med. H. G. Lasch

Referent: Prof. Dr. med. H. A. Kühn

Correferent: Prof. Dr. med. Mueller-Eckhardt



INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	Seite 1
II.	Material	Seite 4
III.	Methoden	Seite 5
IV.	Ergebnisse	Seite 7
V.	Diskussion	Seite 22
VI.	Zusammenfassung	Seite 25
VII.	Literaturverzeichnis	
VIII.	Lebenslauf	

UNTERSUCHUNGEN ZUR URSACHE DER THROMBOPENIE BEI DER EXPERIMENTELLEN GALAKTOSAMINHEPATITIS DER RATTE

EINLEITUNG

Durch i.p.-Applikation von Galaktosaminhydrochlorid (ca. 600 mg/kg K.G.) an Nagetieren läßt sich eine Leberschädigung auslösen, die histologisch eine gewisse Ähnlichkeit mit der Virushepatitis des Menschen hat (17, 10, 15).

Bei der so ausgelösten experimentellen Hepatitis der Ratte nehmen, vergleichbar der menschlichen Hepatitis, die Serumkonzentrationen des Bilirubins, der Transaminasen und der alkalischen Phosphatase zu (Tab. 1) (18, 14). Die Gerinnungsfähigkeit des Blutes nimmt ab, da gleichzeitig eine erhebliche Verminderung der plasmatischen Gerinnungsfaktoren des Prothrombinkomplexes vorliegt. Während dieser Phase der verminderten Gerinnungsfähigkeit lassen sich ebenfalls ein verminderter Serumfibrinogengehalt und eine Thrombopenie (ca. 50 % der Norm) feststellen (8).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die Ursache des Thrombozytenabfalls bei der Galaktosaminhepatitis der Ratte zu untersuchen (Tab. 2).

Die Thrombopenie kann im wesentlichen durch drei Mechanismen ausgelöst werden:

1. eine verminderte Bildung der Blutplättchen im Knochenmark (z.B. Antimetabolit-Therapie, Leukämie etc.),
2. ein erhöhter Verbrauch der Thrombozyten in der Peripherie bei Zuständen, die zu einer Verbrauchskoagulopathie (z.B. Septicopyämie, Lebercirrhose mit portaler Hypertension) führen,
3. durch eine Funktionsänderung der Thrombozyten und nachfolgend gesteigertem Abbau in der Milz.

Zur Untersuchung der Ursache der Thrombopenie sollte zunächst geklärt werden, ob sich bei der Galaktosaminhepatitis der Ratte eine veränderte Thrombozytenfunktion, die die Thrombopenie bedingen könnte, nachweisen ließ.

Dazu war es zunächst nötig, einen empfindlichen Thrombozytentest zu entwickeln, da bei diesem Modell der experimentellen Hepatitis nur geringe Blutmengen dem einzelnen Versuchstier entnommen werden und aus Kostengründen nicht beliebig viele Tiere untersucht werden konnten. Dabei wurde von folgenden Vorstellungen ausgegangen: in vitro kann durch Zusatz von Thrombin oder ADP + Ca eine sofortige Änderung der Thrombozytenfunktion erreicht werden. Die sich dabei ergebenden morphologischen und biochemischen Veränderungen werden unter den Begriffen "Thrombozyten-Aggregation" und "visköse Metamorphose", die als irreversible Plättchenschädigung anzusehen ist, zusammengefaßt (5, 3, 16). Eine typische Stoffwechseländerung in dieser Phase ist durch deutlich erhöhten Energieverbrauch (Glykogenabfall, erhöhte Glucosedissimilation, erhöhter Sauerstoffverbrauch, ATP-Abfall) gekennzeichnet (20). Im einzelnen ist nicht bekannt, für welche Stoffwechselleistungen diese Energie gebraucht wird. Eine Ursache könnte darin liegen, daß bei Thrombozyten in dieser Phase vermehrt Energie verbrauchende Synthesen ablaufen.

Da die Einwirkung von Thrombin bzw. ADP + Ca schließlich mit dem Verlust der Integrität der Thrombozyten einhergeht, lag es nahe, ähnliche Veränderungen der Thrombozytenfunktion als Ursache der Thrombopenie anzusehen.

Von diesen Überlegungen ausgehend, wurde die Inkorporation von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten als Maß einer Syntheseleistung zunächst unter den Bedingungen der viskösen Metamorphose und später bei Thrombozyten von Ratten mit Galaktosaminhepatitis untersucht.

ERLÄUTERUNGEN der in der vorliegenden Arbeit verwandten Abkürzungen

ADP :	Adenosindiphosphat
AP :	Alkalische Phosphatase
ATP :	Adenosintriphosphat
GPT :	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
DPM :	Desintegrations per minute
KBR :	Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer
TCS :	Trichloressigsäure

MATERIAL

ADENOSIN-5' -DIPHOSPHAT:	C.F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim
CALCIUM-CHLORID M/40:	Behring-Werke, Marburg/Lahn
D-GALAKTOSAMINHYDROCHLORID: (puriss.)	Carl Roth OHG, Karlsruhe
HEPARIN-VITRUM 5000 IE/ml:	Deutsche Kabi GmbH, München
^{14}C -LEUCIN (spez. Aktivität 6,5 mCi/mMol)	
^{14}C -LEUCIN (spez. Aktivität 10 mCi/mMol):	Buchler & Co, Braunschweig
PROTEINSTANDARD:	(Human crystallized Albumin) DADE Cat. No B 5158 Code: Prostan, DADE Reagents Inc. Miami, Florida
TEST-THROMBIN:	Behring-Werke, Marburg/Lahn

MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT

Die Radioaktivität wurde gemessen im

TRI-CARB-LIQUID-SCINTILLATION-COUNTER Modell Nr. 3375

(Firma Packard, Frankfurt/Main)

SCINTILLATOR-SUBSTANZEN: Firma Packard, Frankfurt/Main

TIERMATERIAL

Männliche Albinoratten vom Stamm FW 49 (150 - 350 g) der Firma Dr. Karl THOMAE,
Biberach a.d. Riss

METHODEN

1. Galaktosaminhepatitis

Zur Erzeugung einer Galaktosaminhepatitis wurde den Ratten 1,0 ml physiologische Kochsalzlösung, in der 1000 mg/kg K.G. Galaktosaminhydrochlorid gelöst waren, intraperitoneal gespritzt.

2. Thrombozytenisolierung

Die Blutentnahme erfolgte durch Herzpunktion in Äthernarkose. Ungerinnbar wurde das Blut mittels Heparin vitrum gemacht, indem dieses einmal in den Spritzen aufgezogen und wieder ausgespritzt wurde.

Zur Gewinnung der Thrombozyten wurde das Blut in silikonisierte Zentrifugengläser gegeben und 5 Min. bei 250 g und 3° C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehebert und in den Kühlschrank gestellt. Das Wiederauffüllen des Rückstandes erfolgte mit NaCl (0,9 %). Darauf wurde erneut zentrifugiert, ebenfalls 5 Min. bei 250 g und 3° C, der sich ergebende Überstand vorsichtig abgehebert und dem ersten, kühlgestellten hinzugefügt. Der gemeinsame Überstand (thrombozytenreiches Plasma) wurde 10 Min. bei 6000 g und 3° C zentrifugiert. Die Thrombozyten imponierten als weißer Bodenbelag in der Reagenzglaskuppe. Nach dem Abgießen des thrombozytenfreien Überstandes erfolgte das Waschen der Blutplättchen in 5 ml NaCl (0,9 %). Für gleiche Verteilung sorgte ein Rührmagnet (10 - 15 Min.). Nun wurde wieder 10 Min. bei 6000 g und 3° C scharf abzentrifugiert, der Überstand abgehebert und die zurückgebliebenen Thrombozyten in der für die Versuchsansätze gewünschten Menge NaCl (0,9 %) mit dem Rührmagnet in Suspension gebracht (15 - 20 Min.).

3. Thrombozytenzählung

Sie erfolgte mit einer Thoma-Zählkammer im Phasenkontrastmikroskop. Die Verdün-

nung erfolgte mit einer 1%igen Novocain-Lösung. Ausgezählt wurden jeweils 5 Gruppenquadrate. Methode nach FEISSLY-LÜDIN (6).

4. Inkorporation von ^{14}C -Leucin

(Inkubationsansatz und Aufarbeitung)

In silikonierte Zentrifugengläser wurden Tris-Puffer (pH 7,4/0,2 m), ^{14}C -Leucin, Thrombin bzw. ADP und als Starter der Reaktion die Thrombozytensuspension gegeben. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 30°C . Gestoppt wurde der ^{14}C -Leucin-Einbau mit HClO_4 (0,6 m).

Das durch die Perchlorsäure denaturierte Protein konnte bei 2000 g und 3 Min. abzentrifugiert werden. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden dem Satz ein paar Tropfen HClO_4 (0,6 m) hinzugefügt, mit einem Glasstab gut verrührt und weitere 5 ml HClO_4 (0,6 m) einpipettiert. Darauf erfolgte wieder Zentrifugieren bei 2000 g und 3 Min. Das gleiche geschah je einmal mit absolutem Äthylalkohol und mit Diäthyläther. Nachdem der Äther abgegossen und der Rückstand getrocknet war, wurde dieser in 0,5 ml Ameisensäure (98 - 100 %) gelöst; 0,4 ml davon waren mit 10 ml THIX-GEL-Scintillator zur Zählung der Radioaktivität bestimmt.

5. BORN-Test

Die Bestimmung der Plättchenfunktion geschah mit dem Aggregometer nach BORN. In diesem Test wird die "optical density" nach ADP-Zugabe zu plättchenreichem Plasma sowie die Desaggregationsgeschwindigkeit dargestellt.

6. Proteinbestimmung mit dem Biuretreagenz .

7. Bestimmung der Thrombinzeit mit Test-Thrombin der Behring-Werke Marburg/Lahn.

ERGEBNISSE

a) Methodische Untersuchungen

Wie Abb. 1 zeigt, besteht eine lineare Abhängigkeit der ^{14}C -Leucin-Inkorporation zur eingesetzten Thrombozytenmenge. Da, wie später gezeigt wird, diese Inkorporation von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten zusätzlich durch Cycloheximid gehemmt werden kann (Tab. 11), darf aus dem Versuch geschlossen werden, daß in den Thrombozyten Protein synthetisiert wird.

Aus Abb. 2 geht hervor, daß bei Zusatz von Thrombin diese Linearität nicht mehr besteht. Möglicherweise werden durch Thrombin aus den Thrombozyten Substanzen freigesetzt, die ihrerseits dosisabhängig die Inkorporation von ^{14}C -Leucin stimulieren. Diese Freisetzung aktivierender Substanzen scheint in Abhängigkeit zur Inkubationszeit zu erfolgen, wenn gleiche Thrombozytenmengen mit Thrombin verschieden lange inkubiert werden.

In Abb. 3 wird gezeigt, daß die Inkorporation von ^{14}C -Leucin mit Zusatz von Thrombin bei zunehmender Inkubationszeit systematisch gesteigert wird. Diese Versuche sprechen dafür, daß Thrombin mittelbar den Einbau von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten steigert.

Tab. 3 zeigt Versuche, die diese Annahme belegen. Durch Zusatz von Thrombin bei sonst gleichem Inkubationsansatz wird der Leucin-Einbau deutlich stimuliert.

Da durch Thrombinzugabe zum Inkubationsansatz mit Thrombozyten, wie in der Einleitung besprochen, eine visköse Metamorphose der Thrombozyten eingeleitet wird, die möglicherweise Ursache der erhöhten Leucin-Inkorporation sein könnte, war zu prüfen, ob auch andere Versuchsbedingungen, die zur viskösen Metamorphose führen, eine Erhöhung der Leucin-Inkorporation bedingen.

Wie Tab. 4 zeigt, kann ebenfalls durch ADP-Zusatz zum Inkubationsmedium die Leucin-Inkorporation in Thrombozyten erheblich gesteigert werden.

Es ist bekannt, daß ADP in Gegenwart von Calciumionen in Thrombozytensuspension

eine visköse Metamorphose auslösen kann (3, 20).

b) Untersuchungen an Thrombozyten von Ratten mit Galaktosaminhepatitis

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß die Inkorporation von ^{14}C -Leucin durch Einleiten einer viskösen Metamorphose, die, wie bereits einleitend ausgeführt, letztlich zum Verlust der Thrombozytenintegrität führt, stimuliert werden kann. Aus einer erhöhten Leucin-Einbaurate in Thrombozyten mußte dann umgekehrt gefolgert werden, daß diese Thrombozyten im oben angegebenen Sinn als verändert anzusehen sind. In der Folge wurde deshalb eine erhöhte Einbaurate als Kriterium für eine veränderte Thrombozytenfunktion angesehen.

Die bisherigen Untersuchungen wurden an Thrombozyten durchgeführt, die nach mehreren Waschvorgängen (siehe Methodik !) in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt worden waren. Dadurch wurden bislang die bei der Blutentnahme verwandten gerinnungshemmenden Substanzen herausgewaschen (Na-Citrat). Diese Waschvorgänge würden bei vergleichenden Untersuchungen mit Thrombozyten aus Normaltieren und aus Tieren mit Galaktosaminhepatitis einen methodischen Unsicherheitsfaktor bedeuten, so daß untersucht werden mußte, ob die Anwesenheit gerinnungshemmender Substanzen im Inkubationsansatz einen Einfluß auf die Leucin-Inkorporation bedeutet.

Wie aus Tab. 5 hervorgeht, wird durch Calcium bindende gerinnungshemmende Substanzen der Einbau von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten deutlich vermindert.

Heparin als Antikoagulans beeinflusst die Einbaurate jedoch nicht wesentlich, so daß in den folgenden Untersuchungen diese Substanz als Antikoagulans verwendet wurde.

Untersucht man daraufhin den ^{14}C -Leucin-Einbau in Thrombozyten von Tieren mit Galaktosaminhepatitis im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv, so läßt sich 24

Stunden nach Galaktosaminapplikation ein deutlich verstärkter Leucin-Einbau in die Thrombozyten nachweisen (Tab. 6).

Dieser Befund läßt sich auch noch - wenn auch nicht so eindeutig - 48 Stunden nach Gabe von Galaktosamin nachweisen (Tab. 7). Diese erhöhte ^{14}C -Leucin-Inkorporation in Thrombozyten von Tieren mit Galaktosaminhepatitis ist nicht auf einen direkten Einfluß des Galaktosamins zurückzuführen, da - wie Tab. 8 zeigt - Galaktosamin in verschiedener Konzentration im Testansatz den ^{14}C -Leucin-Einbau nicht verändert.

Die bisherigen Untersuchungen haben also ergeben, daß Thrombozyten von Ratten mit Galaktosaminhepatitis vermehrt Leucin in vitro inkorporieren. Zusammen mit den aufgeführten methodischen Untersuchungen, die gezeigt hatten, daß bei Auslösen einer viskösen Metamorphose die Einbaurate von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten ansteigt, würde dieser Befund auf eine Funktionsänderung der Thrombozyten möglicherweise im Sinne eines Integritätsverlustes schließen lassen. Es wurde deshalb versucht, weitere Hinweise für eine Funktionsänderung der Thrombozyten von Tieren mit Galaktosaminhepatitis zu gewinnen.

Diese ließen sich relativ einfach mit Hilfe der Prüfung des Aggregationsverhaltens der Thrombozyten im BORN-Test gewinnen. Untersucht wurde eine Gruppe von Tieren mit Galaktosaminhepatitis im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv. Bestimmt wurden die Geschwindigkeit der Aggregation, das Ausmaß der Aggregatbildung und der Zeitpunkt der beginnenden Desaggregation.

Abb. 4 und 5 dokumentieren den deutlichen Unterschied im Aggregationsverhalten zwischen Thrombozyten von unvorbehandelten Ratten und solchen, denen 24 Stunden nach einmaliger Applikation (i.p.) von 600 mg/kg Galaktosaminhydrochlorid Blut zur Plättchenisolierung abgenommen wurde. Der Kurvenverlauf zeigt, daß die durch 2×10^{-6} m ADP induzierte Aggregation schneller wieder zu einer Desaggregation

führt. Aus Tab. 9 geht hervor, daß im Durchschnitt die Thrombozyten von vorbehandelten Tieren eine um 7,8 % gesteigerte Aggregationsgeschwindigkeit, eine um 8,5 % verminderte "optical density" und einen um 217,3 % früheren Desaggregationsbeginn im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv aufweisen.

Die "optical density" ist ein Maß für die Lichtdurchlässigkeit einer Thrombozytensuspension. Sie ist im Stadium der Aggregation infolge der Klümpchenbildung erhöht. Im Zuge der Desaggregation lösen sich die Blutplättchen wieder voneinander, was sich, wie aus Abb. 5 ersichtlich, in einer Verminderung der Lichtdurchlässigkeit niederschlägt. Der Zeitpunkt des Desaggregationsbeginns fällt zusammen mit dem der größten Lichtdurchlässigkeit. Zur Bestimmung der Aggregationsgeschwindigkeit wurde in den Kurven am Punkt des Aggregationsbeginns einmal das Lot gefällt und zum anderen die Tangente an die Kurven angelegt und die Entfernung des Lotes vom Ausgangspunkt bis zu dem Punkt gemessen, wo der Abstand vom Lot zur Tangente genau 2,0 cm beträgt.

Diese Untersuchungen belegen, daß Thrombozyten von Ratten mit Galaktosaminhepatitis ein deutlich verändertes Aggregationsverhalten im BORN-Test zeigen. Die Bedeutung dieser Veränderung ist allerdings noch unklar, da nicht bekannt ist, welche Thrombozyteneigenschaften die ins Auge fallende rasche Desaggregation bei der Galaktosaminhepatitis bedingen. Auch sind uns bislang keine systematischen Untersuchungen über das Aggregationsverhalten von Rattenthrombozyten bekannt.

Abschließend wurde untersucht, ob der Thrombozytenabfall bei Ratten mit Galaktosaminhepatitis durch eine gleichzeitige Heparin-Therapie verhindert werden kann. Dies würde dafür sprechen, daß die Thrombopenie durch einen erhöhten Gerinnungsumsatz in der Peripherie ausgelöst sein könnte (Verbrauchskoagulopathie).

Wie Tab. 8 zeigt, läßt sich jedoch durch diese zusätzliche Heparin-gabe der Thrombo-

zytenabfall nicht verhindern. In der oberen Hälfte der Tab. 10 ist gezeigt, daß die Thrombozytenzahl bei mit Heparin behandelten Kontrollen wesentlich stärker ansteigt als bei Tieren mit Galaktosaminhepatitis; in dieser Gruppe wird durch Heparinzusatz nur ein geringer Thrombozytenanstieg erreicht. Auch in einer zweiten Untersuchungsreihe (untere Hälfte der Tab. 10), in der durch zweimalige Applikation von 750 E Heparin s.c. eine eindeutige Verlängerung der Thrombinzeit zum Zeitpunkt der Untersuchung erzielt werden konnte, ließ sich kein Einfluß der Heparintherapie auf die Thrombozytenzahl bei Tieren mit Galaktosaminhepatitis nachweisen.

Untersuchungsbedingungen	n	Bilirubin (mg%)	GPT (mU/ml)	AP (mU/ml)	Quick (%)
Kontrolle	5	0,31 $\pm$ 0,1	24,7 $\pm$ 5,2	335,5 $\pm$ 65	100
24 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	3	0,18 $\pm$ 0,14	89,7 $\pm$ 78	426 $\pm$ 145	14
48 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	3	3 $\pm$ 2,8	403 $\pm$ 247	765 $\pm$ 163	< 1

Tab. 1 Verhalten von Bilirubin, GPT, AP und Quick im Serum oder Plasma von Tieren mit Galaktosaminhepatitis im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv (nach 14).

Untersuchungsbedingungen	n	Thrombozyten
Kontrolle	7	459.000 $\pm$ 129.000
24 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	10	287.000 $\pm$ 101.000
Kontrolle	3	540.000 $\pm$ 180.000
36 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	5	338.000 $\pm$ 87.000
Kontrolle	3	342.000 $\pm$ 113.000
48 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	11	194.000 $\pm$ 93.000

Tab. 2 Thrombozyten im Plasma bei Tieren mit Galaktosaminhepatitis im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

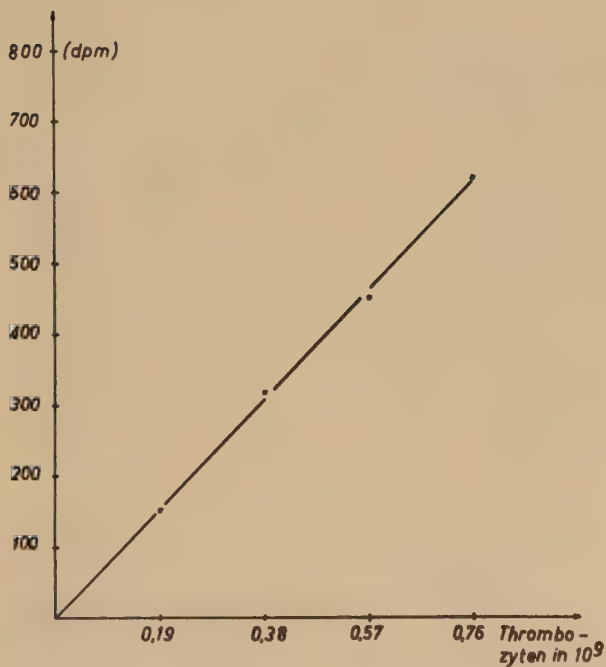


Abb. 1 Abhängigkeit der ^{14}C -Leucin-Inkorporation (dpm) in vitro von der eingesetzten Thrombozytenmenge. Der Inkubationsansatz enthält $1 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Leucin, 0,5 ml Tris-Puffer (pH 7,4; 0,2 m) und Thrombozyten in NaCl in der angegebenen steigenden Zahl in 1,5 ml Ansatz.

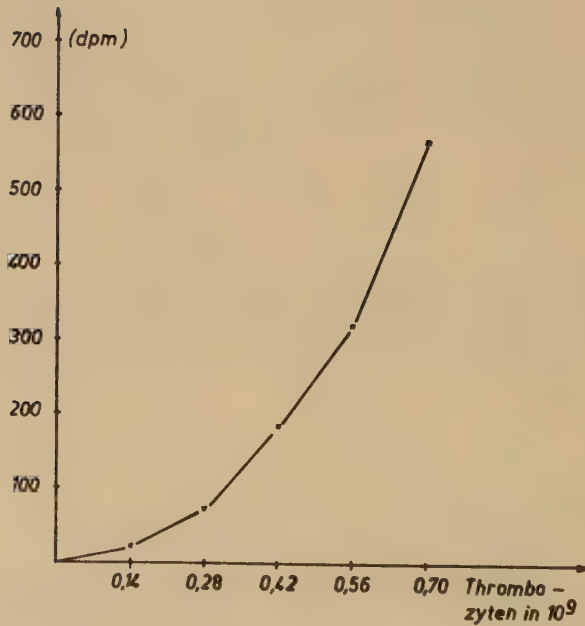


Abb. 2 Abhängigkeit der ^{14}C -Leucin-Inkorporation (dpm) in vitro von der eingesetzten Thrombozytenmenge. Inkubationsansatz wie bei Abb. 1, jedoch mit 1,2 E Test-Thrombin in 1,28 ml Gesamtansatz.

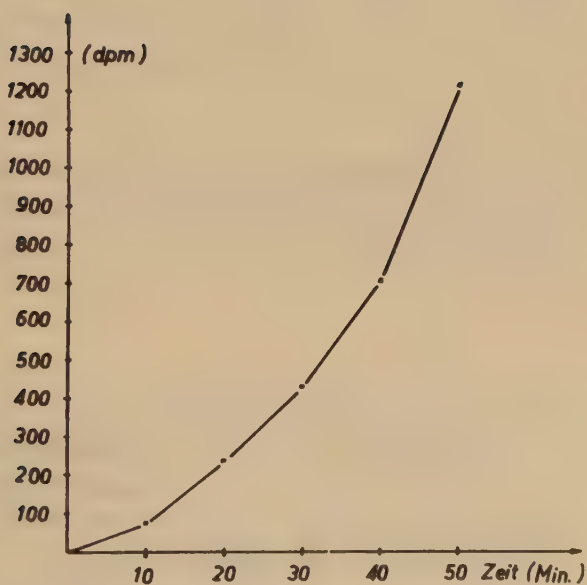


Abb. 3 Abhängigkeit der ^{14}C -Leucin-Inkorporation (dpm) in vitro von der Inkubationszeit. Inkubationsansatz wie bei Abb. 2, jedoch pro Ansatz $0,68 \times 10^9$ Thrombozyten.

Versuchsbedingungen	n	^{14}C -Leucin-Einbau (dpm/ 10^9 Thrombozyten)
Kontrolle	8	468 ± 170
+ Thrombin	8	718 ± 273
p		$< 0,025$

Tab. 3 Einfluß von Thrombin auf den Einbau von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten in vitro. Inkubationsansatz siehe Abb. 1 und 2. Inkubationsdauer 30 Min. bei 30°C .

Versuchsbedingungen	n	^{14}C -Leucin-Einbau (dpm/ml Thrombozyten- suspension)
Kontrolle	5	304 ± 126
+ ADP (10^{-5}M)	5	1672 ± 547
p		$< 0,0005$

Tab. 4 Einfluß von ADP auf die Inkorporation von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten in vitro. Der Inkubationsansatz enthielt (s. Abb. 1) zusätzlich 10^{-4} M Ca .

Versuchsbedingungen	n	Zeit (Min.)	¹⁴ C-Leucin-Einbau dpm/ Versuchsansatz	
				% der Kontrolle
Kontrolle	1	30	202	-
Na-Citrat	1	30	103	51,0
Na-Oxalat	1	30	98	48,5
EDTA	1	30	108	53,5
Heparin vitrum	1	30	171	84,7
Kontrolle	1	60	333	-
Na-Citrat	1	60	112	33,6
Na-Oxalat	1	60	110	33,0
EDTA	1	60	117	35,2
Heparin vitrum	1	60	305	91,6

Tab. 5 Einfluß verschiedener gerinnungshemmender Substanzen auf den Einbau von ¹⁴C-Leucin in vitro im Vergleich zu einer Kontrolle.

Die Thrombozyten wurden, wie in der Methodik beschrieben, isoliert und die zu prüfenden Substanzen wie folgt dem Inkubationsansatz in vitro zugesetzt:

1,0 ml einer 3,8 %igen Na-Citratlsg. in 2,0 ml Ansatz

1,0 ml einer 1,34 %igen Na-Oxalatlsg. in 2,0 ml Ansatz

0,08 ml einer 5 %igen Lösung des Di-Na-Salzes der Äthylendiamintetra-essigsäure (EDTA)

in 2,0 ml Ansatz

900 I.E. Heparin vitrum

in 2,0 ml Ansatz

Versuchsbedingungen	n	^{14}C -Leucin-Einbau dpm/mg Protein
Kontrolle	6	732 ± 206
24 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	6	1315 ± 374
p		$< 0,025$

Tab. 6 Einbau von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten in vitro von Tieren mit Galaktosaminhepatitis im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

Versuchsbedingungen	n	^{14}C -Leucin-Einbau (dpm/ 10^9 Thrombozyten)
Kontrolle	1	1220
48 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	3	1409 ± 57
Kontrolle	2	397 ± 47
48 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	1	553
Kontrolle	2	2760 ± 731
48 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	2	3850 ± 730
Kontrolle	4	504 ± 27
48 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	4	531 ± 142
Kontrolle	4	915 ± 296
48 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	4	1482 ± 488
p		$< 0,05$

Tab. 7 Einbau von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten in vitro von Tieren mit Galaktosaminhepatitis im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.
In der Tabelle sind fünf aufeinanderfolgende Versuche aufgeführt.

Versuchsbedingungen	n	^{14}C -Leucin-Einbau (dpm/ml Thrombozytensuspension)
Kontrolle	1	222
10^{-4}M Galaktosamin	1	230
10^{-3}M Galaktosamin	1	226
10^{-2}M Galaktosamin	1	230

Tab. 8 Einfluß von Galaktosaminzusatz in vitro auf die Inkorporation von ^{14}C -Leucin in Thrombozyten von unvorbehandelten Ratten. - Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf Endkonzentrationen im Versuchsansatz.

Versuchsbedingungen	n	V (mm)	OD (mm)	Desaggregation (mm)
Kontrolle	10	$77,8 \pm 16,6$	$76,3 \pm 16,7$	103 ± 36
24 Std. nach Galaktosamin 600 mg/kg K.G. i.p.	8	$83,9 \pm 8,3$	$69,8 \pm 14,3$	$47,4 \pm 9,2$
p		$< 0,1$	$< 0,05$	$< 0,0005$

Tab. 9 Aggregationsverhalten von Thrombozyten aus Tieren mit Galaktosamin-hepatitis im BORN-Test im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv. Testbedingungen siehe Beschreibung des BORN-Tests auf den Seiten 9 und 10. Die Aggregation der Thrombozyten wurde mit $2 \times 10^{-6}\text{M}$ ADP ausgelöst.

V : Aggregationsgeschwindigkeit OD : Optical density

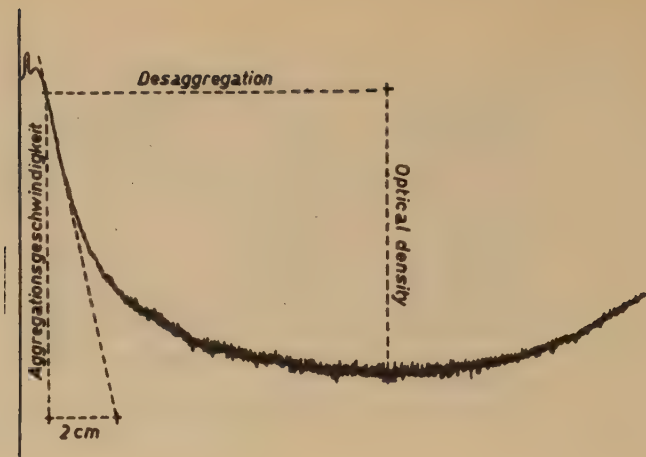


Abb. 4 Aggregationsverhalten von Thrombozyten aus unvorbehandelten Ratten im BORN-Test. Die Aggregation wurde mit 2×10^{-6} m ADP ausgelöst. Beschreibung des BORN-Tests siehe Seiten 9 und 10.

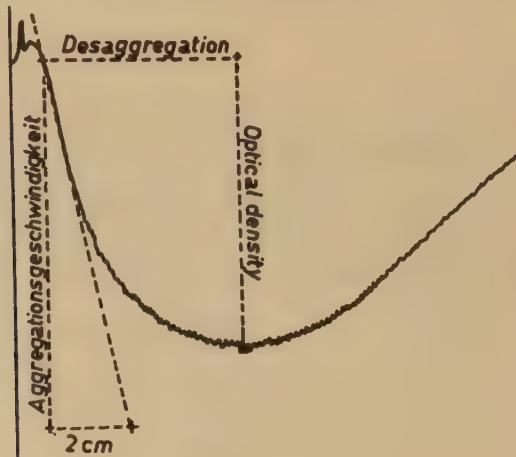


Abb. 5 Aggregationsverhalten von Thrombozyten aus vorbehandelten Ratten im BORN-Test. Der Test wurde 24 Stunden nach 600 mg/kg Galaktosaminapplikation i.p. durchgeführt. Die Aggregation wurde mit 2×10^{-6} m ADP ausgelöst.

Versuchsbedingungen	n	Thrombozyten/ml	Thrombinzeit (sec)
Kontrolle	4	410.000 $\pm$ 83.000	62,2
24 Std. nach Heparin vitrum 3000 E/kg K.G. s.c.	4	540.000 $\pm$ 139.000	63,0
24 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	5	260.000 $\pm$ 79.000	109,1
24 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p. + Heparin vitrum 3000 E/kg K.G.s.c.	2	310.000 $\pm$ 99.000	124,3
Kontrolle	3	550.000 $\pm$ 147.000	44,1
24 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p.	5	312.000 $\pm$ 124.000	52,1
24 Std. nach Galaktosamin 1000 mg/kg K.G. i.p. + Heparin vitrum 2 x 750 E/kg K.G. s.c.	5	324.000 $\pm$ 142.000	119,0

Tab. 10 Einfluß einer Heparintherapie auf den Thrombozytenabfall bei Galaktosaminhepatitis der Ratte.

	Untersuchungsbedingungen				% der Kontrolle
	Kontrolle		+ 5x10 ⁻³ M Cycloheximid in der Endkonz.		
	n		n		
¹⁴ C-Leucin-Einbau (dpm/0,5 ml Thrombozyten- suspension)	1	1032	2	516 ± 4	50
	2	338 ± 126	1	179	53
	1	97	1	70	72
	2	734 ± 59	2	665 ± 137	91
	2	638 ± 16	2	496 ± 27	78
	1	651	1	484	74
	1	325	1	173	53

Tab. 11 ¹⁴C-Leucin-Einbau in Thrombozyten von unvorbehandelten Ratten unter dem Einfluß von Cycloheximid in der angegebenen Konzentration im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen sollten erste Hinweise dafür geben, wie man sich die bei Ratten mit Galaktosaminhepatitis auftretende Thrombopenie zu erklären hat. Ganz besonders wurden dabei Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion in den Vordergrund gestellt. Da von einem kleinen Laboratoriumstier, wie der Ratte, nur kleine Blutmengen und somit auch nur kleine Thrombozytenmengen zu gewinnen waren, kamen biochemische Untersuchungen, z.B. zum Sauerstoffverbrauch oder zum Glykogengehalt der Thrombozyten, als Maß für die Thrombozytenfunktion kaum in Frage. Da bekannt ist, daß in Thrombozyten bei verstärkter Neigung zur Aggregation vermehrt Energie liefernde Reaktionen ablaufen (20), wurde deshalb zunächst versucht, eine möglicherweise daraufhin erhöhte Syntheseleistung mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen zu messen, um damit einen auch an geringen Thrombozytenmengen meßbaren Parameter in die Hand zu bekommen.

Wie im Ergebnisteil dargestellt, läßt sich durch Zusatz kleiner Mengen Thrombin und kleiner Mengen ADP ein gesteigerter Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in vitro erzielen. Unter diesen Versuchsbedingungen wird im Vergleich zur Kontrolle eine langsam ablaufende Aggregation der Thrombozyten ausgelöst. Diese Untersuchungen wären zunächst so zu deuten, daß eine langsam eintretende visköse Metamorphose nach vorangegangener Aggregation und ein gesteigerter Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in dieser Phase parallel ablaufen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, daß der gesteigerte ^{14}C -Leucin-Einbau durch Cycloheximid im Medium verhindert werden kann, wobei makroskopisch gleichzeitig eine Hemmung der Aggregation zu beobachten ist (Tab. 10).

Aufgrund dieser Beobachtung muß auch der erhöhte ^{14}C -Leucin-Einbau in Thrombozyten in vitro als Ausdruck einer gesteigerten Proteinsynthese interpretiert werden, zumal Beobachtungen anderer Autoren vorliegen, in denen gezeigt wurde, daß Thrombozyten Protein synthetisieren können (19, 4). Das Ergebnis dieser Voruntersuchungen ließ es gerechtfertigt erscheinen, Änderungen der Einbaurate radioaktiv markierter Aminosäuren in Thrombozyten in vitro als Hinweis für eine veränderte Thrombozytenfunktion (Aggregationsneigung) zu werten.

Die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen (Tab. 6 und 7) zeigen, daß bei Parallelisierung von Thrombozyten aus normalen Kontrolltieren und aus Ratten mit Galaktosaminhepatitis sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Galaktosaminapplikation ein gesteigerter Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren nachweisbar ist. Gleichzeitig läßt sich unter diesen Untersuchungsbedingungen im BORN-Test eine veränderte Thrombozytenfunktion insofern nachweisen, als es zu einer geringfügig rascheren und ausgiebigeren Aggregation und zu einer eindeutig früher einsetzenden Desaggregation der Thrombozyten in vitro kommt.

Es ist zur Zeit nicht möglich, diese Befunde miteinander zu korrelieren, da über das Aggregationsverhalten von Rattenthrombozyten im BORN-Test keine näheren Untersuchungen vorliegen und somit zunächst der Befund einer rascheren Desaggregation nicht wertend interpretiert werden kann. Sowohl die Untersuchung des Aminosäureeinbaus als auch das Aggregationsverhalten der Thrombozyten von Tieren mit Galaktosaminhepatitis zeigen aber an, daß eine veränderte Thrombozytenfunktion vorliegen muß, wobei die methodischen Vorversuche darauf hinweisen, daß dem erhöhten Aminosäureeinbau eine Neigung zur verstärkten Aggregation parallel gehen könnte. Es besteht also die Möglichkeit, daß die Thrombozyten von Tieren mit Galaktosaminhepatitis in ihrer Funktion verändert

sind und daß diese Funktionsänderung die Ursache der bei Galaktosaminhepatitis beobachteten Thrombopenie sein könnte. Dieser Deutung kommt die Beobachtung entgegen, daß der Thrombozytenabfall nicht durch eine Heparinbehandlung der Tiere verhindert werden kann. Die ergänzend durchgeführten anderen Gerinnungsuntersuchungen (9) haben bislang keinen sicheren Hinweis dafür ergeben, daß eine verstärkt ablaufende intravaskuläre Gerinnung (Verbrauchskoagulopathie) (11, 12) eine bedeutende Ursache der Thrombopenie darstellen könnte. Die in der Leber synthetisierten Gerinnungsfaktoren (13, 7, 1) und das Fibrinogen (2), die im Blut bestimmt wurden, fallen beträchtlich ab. Dieser Abfall muß auf eine verminderte Synthese in der Leber zurückgeführt werden (18, 14).

Als weitere Ursache der Thrombopenie wäre noch eine verminderte Bildung oder Freisetzung von Thrombozyten zu diskutieren. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu keine Untersuchungen durchgeführt. Bei der Erstbeschreibung dieser experimentellen Hepatitis wurde aber von den Autoren betont, daß die durch Galaktosamin in der Leber ausgelösten Veränderungen organspezifisch seien und an anderen Organen keine pathologischen Veränderungen nachweisbar wären.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Ursache der Thrombopenie, die bei der Galaktosaminhepatitis der Ratte auftritt, untersucht.

In methodischen Voruntersuchungen wird zunächst gezeigt, daß Thrombozyten unter den Bedingungen der verzögert ablaufenden "viskösen Metamorphose" vermehrt ^{14}C -Leucin inkorporieren.

Daraufhin wurde in vergleichenden Untersuchungen die ^{14}C -Leucin-Inkorporation an Thrombozyten von Ratten mit Galaktosaminhepatitis gegenüber normalen Kontrollen erhöht gefunden. Gleichzeitig zeigten Thrombozyten von Ratten mit Galaktosaminhepatitis ein verändertes Aggregationsverhalten im BORN-Test.

Diese Ergebnisse werden als Hinweis darauf gewertet, daß die Thrombozyten bei Galaktosaminhepatitis in ihrer Funktion verändert sind und somit möglicherweise einem rascheren Abbau in der Milz unterliegen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BARNHARDT, M.I.:

Prothrombin synthesis : an example of hepatic function

Sonderdruck aus: The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol. 13,
Nr. 8 (1965)

2. BARNHARDT, M.I. et al.

Thrombotic thrombocytopenie purpura as a model of accelerated protein synthesis

Sonderdruck aus: Thromb. Diath. haemorrh. Vol. 12, Nr. 1/2

3. BETTEX-GALLAND, M., LÜSCHER, E.F.:

Studies on the metabolism of human blood platelets in relation to clot retraction

Thromb. Diath. haemorrh. 4, 178-195 (1960)

4. BOOYSE, F.M., RAFELSON, M.E.:

Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets

Biochem. biophys. Acta 145, 188 (1967)

5. BORN, G.V.R., ESNOUF, M.P.:

Biochemical changes in platelet-rich plasma during clotting

Proc. 4th Intern. Congr. Biochem. Wien 1958, Vol. X, Pergamon Press 1959,
97-104 (1959)

6. FEISSLY, R.:

Rev. Hématol. 4, 481 (1949)

7. HILL, R.B. et al.

Vitamine K and biosynthesis of protein and prothrombin

J. biol. Chem. 243, 3930 (1968)

8. HÖRDER, M.H., et al.

Unveröffentlichte Ergebnisse

9. HÖRDER, M.H., et al.

Unveröffentlichte Ergebnisse

10. KEPPLER, D., REUTTER, W., LESCH, R., DECHER, K.:

Biochemische Untersuchungen zum Mechanismus der Galaktosaminhepatitis

6. Tagung der Europäischen Gesellschaft zum Studium der Leber (EASL)

11. LASCH, H.G., KRECKE, H.J., RODRIGUEZ-ERDMANN, F., SESSNER, H.H.,

SCHÜTTERLE, F.:

Verbrauchskoagulopathien (Pathogenese und Therapie)

Folia haemat. N.F. 6, 326 (1961)

12. LASCH, H.G., ROKA, L., HEENE, D.:

Experimental intravascular clotting

Pathogenesis and treatment of thromboembolic diseases

Intern. Symp. Basel, F.K. Schattauer Verlag 533-542 (1966)

13. LASCH, H.G., ROKA, L.:

Zur Prothrombinbildung in der Leber

Z. phys. Chem. 294, 30 (1953)

14. LAUN, A.:

Histologische, biochemische und klinisch-chemische Untersuchungen bei der

Galaktosaminhepatitis der Ratte

Inaugural-Dissertation Gießen 1970 in Vorbereitung

15. LESCH, R., REUTTER, W., KEPPLER, D., DECHER, K.:

Das morphologische Bild der Galaktosaminschädigung der Rattenleber

75. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 14. bis

17. April 1969

16. LÜSCHER, E.F.:

Die Physiologie der Blutplättchen

Sonderdruck aus Schweiz. med. Wschr. 98, Nr. 42, 1629-1635 (1968)

17. REUTTER, W., KEPPLER, D., LESCH, R., DECHER, K.:

Galaktosaminhepatitis

Sonderdruck aus "Die Naturwissenschaften" 10, 497 (1968)

18. STARGARDT, M.:

Die Entwicklung der pathologischen Leberveränderungen bei der Galaktosaminhepatitis der Ratte in Abhängigkeit von Zeit und Dosierung

Inaugural-Dissertation Gießen 1970 in Vorbereitung

19. STEINER, M., BALDINI, M.:

Protein synthesis in aging blood platelets

Blood 33, 628 (1969)

20. WEBER, E.:

Die Beeinflussung biochemischer und morphologischer Merkmale von Blutplättchen durch gerinnungsfördernde und proteolytische Agentien

Habilitationsschrift Heidelberg 1965

Herrn Prof. Dr. med. H.A. Kühn danke ich für den Arbeitsplatz in seinem Labor, Herrn Dr. med. E. Richter für die Überlassung des Themas und für seine wertvollen Ratschläge und Hinweise bei der Durchführung und Herrn Dr. med. D. Heene für die freundliche Durchsicht meiner Dissertation.

LEBENS LAUF

Am 25.4.1944 wurde ich, Manfred Conradt, als Sohn des Bruno Conradt und seiner Ehefrau Minna geb. Bollenbach in Rooneck, Kreis Hohensalza, geboren.

Im Januar 1945 siedelten meine Eltern mit mir nach Barnsen (Lüneburger Heide)

über, wo ich acht Jahre die Volksschule besuchte. Vom 1.4.1958 bis zum

31.3.1961 lernte ich als Jungwerker bei der Deutschen Bundesbahn. Während dieser Zeit holte ich in Uelzen auf der Abendschule die Mittlere Reife nach.

Mit Abschluß der Lehre verließ ich die Deutsche Bundesbahn und ging nach Lüneburg, wo ich anderthalb Jahre die Abendoberschule besuchte.

Im Herbst 1962 kam ich nach West-Berlin und trat in die 12. Klasse einer privaten Abendoberschule ein. Am 10.11.1964 bestand ich dort vor dem Prüfungsausschuß die Reifeprüfung.

Nach meiner Beschäftigung als Hilfspfleger im Evangelischen Waldkrankenhaus

vom 1.12.1964 bis zum 10.4.1965 studierte ich vom Sommersemester 1965 an

sieben Semester Humanmedizin an der Freien Universität in Berlin. Die natur-

wissenschaftliche Vorprüfung legte ich am 15.3.1966, die ärztliche Vorprüfung am 18.3.1968 dort ab.

Nach dem ersten klinischen Semester ging ich zur Fortsetzung mei-

nes Studiums an die Justus Liebig-Universität in Gießen. Das Medi-

zinische Staatsexamen bestand ich hier am 15.7.1971.

